

一种用于植物保护的编码磷酸烯醇式丙酮酸合成酶的基因

技术领域

- 5 本发明涉及植物病原细菌的新的致病相关基因,该基因编码的蛋白质为磷酸烯醇式丙酮酸合成酶,是糖异生途径的关键酶,可用于植物病害的防治。

背景技术

- 植物病害一直是农作物减产、品质降低的主要因子之一。随着病原菌对药物抗性的增强,农药用量在不断增加,这不仅加剧了环境污染、药物残留,也大大提高了农业成本,因此,亟待研发新的防病治病策略和新型的无公害药物。弄清植物病原菌感染寄主的遗传机制是开发新型药物和防病策略的关键,基因组学研究为人们从分子水平上全面、系统地认识植物-微生物的互作关系提供了有效的方法和手段。随着 DNA 测序技术的不断进步,基因组学研究已由以序列测定为主的结构基因组学阶段全面进入了以 ORF 功能解析、基因功能开发为主的功能基因组学时期。高通量、大规模的基因功能的研究为新兴的生命科学产业奠定了基础。目前,已发现的与致病相关的基因主要包括以下几个类型:过敏性与致病性基因(*hrp*) (He 1998);无毒基因(*avr*) (Bonas 1999);致病性因子调节基因(*rpf*) (Barber 1997);胞外酶类基因;胞外多糖合成基因(Tang et al 1991; Dow et al 2000a),脂多糖合成基因(Dow et al 2000b)等。

- 20 获得基因组上单基因位点突变的突变体是研究基因生物学功能的关键。在基因组范围内收集基因失活突变体能够为在基因组水平上研究生物学过程、生命现象提供关键的资源。野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, 简称 *Xcc*)是一种革兰氏阴性细菌,能在全球范围内引起十字花科植物黑腐病,导致农产品的产量和品质严重下降 (Hayward 1993)。本发明的目的是通过建立野油菜黄单胞菌的突变体库和大规模筛库,鉴定与致病相关的新基因,提供可能的防治植物病害的药物靶标。

发明内容

本发明的目的是提供与黄单胞菌致病相关的新基因。

本发明所提供的磷酸烯醇式丙酮酸合成酶基因,具有下列核苷酸序列之一:

- 30 1) SEQ ID NO: 1 的核苷酸序列;

2) 与 SEQ ID NO: 1 的核苷酸序列具有 80% 以上同源性、且编码与 SEQ ID NO: 1 的核苷酸序列所编码的磷酸烯醇式丙酮酸合成酶功能相同的蛋白质的 DNA 序列。

本发明提供的磷酸烯醇式丙酮酸合成酶基因优选具有 SEQ ID NO: 1 的 DNA 序列。

5 携带本发明的磷酸烯醇式丙酮酸合成酶基因的质粒 pXC1950 已在中国普通微生物菌种保藏管理中心保藏，保藏编号为：CGMCC No. 1054，保藏物名称为 JM109/pXC1950，保藏日期为 2003 年 11 月 27 日，保藏物分类命名：大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*)。

SEQ ID NO: 1 的 DNA 是野油菜黄单胞菌 8004 菌株的 DNA，由 2629 个碱基组成。
10 含完整的磷酸烯醇式丙酮酸合成酶基因，自 5' 端的第 201—2576 位核苷酸为该基因的开放阅读框 (Open Reading Frame, ORF)，自 5' 端的第 201—203 位核苷酸为该基因的起始密码子 TTG，自 5' 端的第 2577—2579 位核苷酸为终止密码子 TGA。自 5' 端的第 120—170 位核苷酸为启动子区。

在本发明中，优选与 SEQ ID NO: 1 的核苷酸序列具有 85% 以上同源性、90% 以上同源性、95% 以上同源性、98% 以上同源性或 99% 以上同源性，且编码与 SEQ ID NO: 1 的核苷酸序列所编码的磷酸烯醇式丙酮酸合成酶功能相同的蛋白质的 DNA 序列。
15

SEQ ID NO: 2 的蛋白质是磷酸烯醇式丙酮酸合成酶基因编码的磷酸烯醇式丙酮酸合成酶产物，由 792 个氨基酸组成，该蛋白质的预测分子量为 86.2KD，等电点为 5.12。
20

该基因编码的磷酸烯醇式丙酮酸合成酶含 792 个氨基酸，含有丙酮酸结合结构域 (pyruvate binding domain) 和磷酸烯醇式丙酮酸利用酶、移动结构域 (PEP-utilising enzyme, mobile domain)。

含有本发明开放阅读框及其部分序列的表达载体均属于本发明的保护范围。

25 XC1950 基因的用途：磷酸烯醇式丙酮酸合成酶基因是糖异生途径的关键酶，糖异生途径是细菌抗逆代谢。若阻断糖异生途径，野油菜黄单胞菌对寄主植物的侵袭力显著降低。我们发现对磷酸烯醇式丙酮酸合成酶基因的突变，导致了糖异生途径的阻断。就是说，如果控制了磷酸烯醇式丙酮酸合成酶基因或该基因产物的活性，也就控制了细菌的毒力。因此，磷酸烯醇式丙酮酸合成酶基因及其产物可用作控制细菌性植物病害的药物靶标。
30

附图说明

图 1 为 *XC1950* 基因的克隆酶切电泳图谱。

- 1: λ /*Hind*III 标准 DNA (片段大小从大到小依次为: 23.1kb, 9.4kb, 6.6kb, 2.4kb, 2.0kb); 2:*XC1950* 基因片段; 3:基因克隆 p*XC1950/Bam*HI+*Hind*III。

图 2 为 *XC1950* 基因缺失突变体的 PCR 验证凝胶图。

1: 100bp 标准 DNA(片段大小从大到小依次为: 3kb, 2kb, 1.5kb, 1.2kb, 1kb, 0.9kb, 0.8kb, 0.7kb 等); 2: 野生型 8004; 3-6: *XC1950* 基因缺失突变体。

图 3 为 *XC1950* 基因突变体在以丙酮酸为惟一碳源的培养基上的生长状况

- 1-4: *XC1950* 基因的 Tn5 插入突变体; 5-6: *XC1950* 基因的缺失突变体; 7-8: *XC1950* 基因的缺失突变体的互补株; 9-10: 野生型 8004。

图 4 为 *XC1950* 基因缺失突变体的致病性试验

A 为黄单胞菌野生型菌株;B 为 *XC1950* 基因的缺失突变体; C 为水(空白对照)。

15 实施例

在本发明的实施例中所用到的材料包括:

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 株系 JM109 购自 Promega 公司; 载体 pGEM-3Zf(+) 购自 Promega 公司; 限制性内切酶、修饰酶等试剂购自 Promega、Stratagene、QIAGEN 公司。

- 20 寄主植物为萝卜(种名为 *Raphanus sativus* L.var. *radiculus* Pers.) 从四川省种子公司购买。

野油菜黄单胞菌野生型菌株 *Xcc* 8004 (Tang JL et al. 1990. Cloning of genes involved in negative regulation of production of extracellular enzymes and polysaccharide of *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. Mol Gen Genet. 222:157-160.); 柯斯质粒 pLAFR1 和 pLAFR3(Liu YN et al.1990. A multipurpose broad host range cloning vector and its use to characterise an extracellular protease gene of *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. Mol Gen Genet.220:433-440.); 柯斯质粒 pPH1JI (Hirsch PR et al. 1984. A physical map of pPH1JI and pJB4JI. Plasmid. 12:139-141.); 转座子 Tn5*gusA5* (Zha D et al. 1998. Cloning of DNA sequences involved in exopolysaccharide synthesis of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Wei Sheng Wu Xue Bao. 38:251-255.)。

30

NYGB 培养基：每升中含蛋白胨 5 克、酵母粉 5 克、甘油 20 克，pH7.0。

XC1950 基因扩增引物：由上海生物工程公司根据下面序列合成。

上游引物：XC1950-F: **GG**GGATCC TTTCAGCGGTGATACCGG

下游引物：XC1950-R: **GG**AAGCTT TGCGGCGGCCGCTCCCGC

5 斜体为附加酶切位点序列 (*Bam*HI、*Hind* III)、框线为保护碱基。

实施例 1、野油菜黄单胞菌突变体库的构建

以大肠杆菌和 *Xcc* 中均能复制的柯斯质粒 pLAFR1 为载体将 *Tn5gusA5* 引入 *Xcc* 野生型菌株 8004，然后通过引入不相容质粒 pPH1JI 驱赶 pLAFR1，通过抗生素（卡那霉素）抗性标记筛选 *Xcc* :: *Tn5gusA5* 插入突变体，结合 *Xcc* 全基因组序列和 TAIL-PCR (Thermal Asymetric Interlaced-PCR) (Liu et al 1995) 技术，确定 *Tn5gusA5* 在基因组上的插入位置。通过考察突变体的致病性、胞外酶活性、胞外多糖合成等表型的变化，筛选出致病性降低的突变体 420 个，涉及 51 个基因，其中 5 个属于新的致病相关基因，本发明只涉及其中的一个基因 XC1950。

15 经生物信息学分析 XC1950 基因为磷酸烯醇式丙酮酸合成酶基因。将 *XC1950* 基因的序列，在 Genbank 中进行 BLASTP (生物信息学的一种序列比对工具，由美国国家生物信息中心开发，在互联网上免费使用：<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)，结果显示 *XC1950* 基因在氮-端具有磷酸烯醇式丙酮酸合成酶/丙酮磷酸双激酶 (Phosphoenolpyruvate synthase/ pyruvate phosphate dikinase) 结构域，在碳-端具有磷酸烯醇式丙酮酸利用酶 (PEP-utilising enzyme) 结构域，表明 *XC1950* 基因为磷酸烯醇式丙酮酸合成酶基因，参与糖异生途径。

实施例 2 *XC1950* 基因 (磷酸烯醇式丙酮酸合成酶基因) 的克隆

25 根据 *XC1950* 的基因序列，设计引物，以野油菜黄单胞菌总 DNA 为模板，用 PCR 法扩增该基因全长序列，并将其克隆至 pLAFR3 中，构建基因克隆 pXC1950 并酶切验证 (见图 1)。注：长期保存该基因，克隆于 pGEM3Zf(+)质粒中。

实施例 3、*XC1950* 基因缺失突变体的构建和验证

30 以 pGEM-3Zf(+)为载体，将用 PCR 方法扩增得到的卡那霉素抗性基因 (Kan 基因) 克隆到载体上。设计 PCR 引物，对 *XC1950* 的旁侧序列进行扩增，得左、右旁侧序列

分别命名为 1950L 和 1950R。分别将 1950L 和 1950R 克隆到载体上 Kan 基因的两侧，构建带有 Kan 基因和 XC1950 旁侧序列的重组质粒 pGK1950。将 pGK1950 中的插入片段克隆到具有广泛寄主范围的柯斯质粒 pLAFR3 上，构建质粒 pLGK1950，通过三亲本接合将 pLGK1950 导入野生型 8004 菌株进行同源双交换，再通过两亲本接合和
5 抗生素筛选接合子。所得接合子用 PCR 方法进行鉴定，因 XC1950 缺失突变体与野生型黄单胞菌 8004 菌株具有不同的扩增带型而得以验证（见图 2）。

实施例 4、XC1950 基因突变体在以丙酮酸为惟一碳源的培养基上的生长状况

在以丙酮酸为惟一碳源的培养基（每升含硫酸铵 2.0g, 柠檬酸三钠 1g, 磷酸氢二钾
10 4g, 磷酸二氢钾 6g, 七水硫酸镁 0.2g, 琼脂 15 克, pH7.0）平板上，用牙签点接野生型黄单胞菌、突变菌株、互补菌株（将含有 XC1950 基因的 pXC1950 导入突变菌株，即成互补菌株），28℃ 培养 72 小时。结果表明，XC1950 基因的两种类型的突变体均不能正常生长，而互补菌株和野生型菌株则生长正常（见图 3）。该实验结果表明，XC1950 基因缺失突变，使 Xcc 菌不能利用丙酮酸。

实施例 5、XC1950 基因突变体的致病性检测

实验所用寄主植物为萝卜（种名为 *Raphanus sativus* L. var. *radiculus* Pers.），所用的接种方法为剪叶法。XC1950 基因缺失突变体和野生型菌株进行液体培养，28℃，
15-18 个小时。用 NYGB 稀释到 OD600=0.2，用灭过菌的剪刀在菌液浸泡 5 秒钟后，
20 在健康叶片距叶尖 1-2cm 垂直叶脉的方向剪到中轴处，停留 5 秒钟，25-30℃ 培养，一周后观察结果，正对照选用野油菜黄单胞菌野生型 8004 菌株，负对照用清水。致病试验表明，XC1950 基因的缺失突变体的致病性显著降低。证实 XC1950 基因与野油菜黄单胞菌的致病性有关。

参考文献：

1. Barber CE et al. 1997. A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. Mol. Microbiol 24:555-566
2. Bonas U et al. 1999. Gene-for-gene interactions: bacterial avirulence proteins specify
30 plant disease resistance. Curr. Opinion in Microbiology 2:94~98

3. Dow M et al. 2000a. *Xylella* genomics and bacterial pathogenicity to plants. *Yeast* 17:263~271.
4. Dow M et al. 2000b. The induction and modulation of plant defense resistances by bacterial lipopolysaccharides. *Annu Rev Phytopathol* 38:241-261.
5. 5. Hayward AC. 1993. The hosts of *Xanthomonas*. In: Swings G, Civerolo EL, editors. *Xanthomonas*. London: Chapman and Hall, pp. 1-119.
6. He SY. 1998. Type III protein secretion systems in plant and animal pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36:363~392
7. Hirsch PR et al. 1984. A physical map of pPH1JI and pJB4JI. *Plasmid*. 12:139-141.
- 10 8. Liu YG et al. 1995 Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J.* 8:457-63.
9. Liu YN et al. 1990. A multipurpose broad host range cloning vector and its use to characterise an extracellular protease gene of *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. *Mol Gen Genet.* 220:433-440.
- 15 10. Tang JL et al. 1991. Genetic and molecular analysis of a cluster of *rpf* genes involved in positive regulation of synthesis of extracellular enzymes and polysaccharide in *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. *Mol Gen Genet* 226:409-417.
11. Zha D et al. 1998. Cloning of DNA sequences involved in exopolysaccharide synthesis of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Wei Sheng Wu Xue Bao.* 38:251-255.

20

25

30

中国微生物菌种保藏管理委员会

普通微生物中心

China General Microbiological Culture Collection Center (CGMCC)

地址：北京市海淀区中关村北一条13号，中国科学院微生物研究所

邮政编码：100080

电话：010-62542758

传真：010-62537796

电子邮件：cgmcc@sun.im.ac.cn

受理通知书(收据)

存活性报告书

用于专利程序的微生物保存

发出日期 2003 年 11 月 26 日

(请求保藏人或代理人的姓名、地址)

何勇强

广西大学

广西南宁市大学路100号

本保藏中心登记入册编号

CGMCC No. 1054

你(们)提供的请求保藏并注明以下鉴定

参据的微生物(株)： JM109/pXC1950

申请专利的发明名称

上述请求保藏的微生物(株)附有

☐ 科学描述☒ 建议的分类命名： 大肠埃希氏菌*Escherichia**coli*

申请号NO.

申请日期

年

月

日

该微生物(株)已于 2003 年 11 月 26 日由本保藏中心收到，并登记入册。

根据你(们)的请求，由该日起保存三十年，在期满前收到提供微生物样品的请求后再延续保存五年。

该微生物(株)的存活性经本保藏中心于 2003 年 11 月 26 日检测，结果是

(1) 存活 ☒(2) 失活 ☐

中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心负责人签字和日期

姓名



2003 年 11 月 27 日

权 利 要 求

1、一种编码磷酸烯醇式丙酮酸合成酶的基因 *XCI950*，其核苷酸序列为下列序列
5 之一：

1) SEQ ID NO: 1 的核苷酸序列；

2) 与 SEQ ID NO: 1 的核苷酸序列具有 80% 以上同源性、且编码与 SEQ ID NO: 1 的核苷酸序列所编码的磷酸烯醇式丙酮酸合成酶功能相同的蛋白质的 DNA 序列。

2、根据权利要求 1 所述的基因，其特征在于该基因具有 SEQ ID NO: 1 的 DNA
10 序列。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的基因，其特征在于自 5' 端的第 201—2576 位核苷酸为开放阅读框。

4、权利要求 1 所述的基因在植物病害防治中的应用。

5、根据权利要求 4 所述的应用，其中所述基因可作为药物防治的靶标。

15

20

25

30

1/2

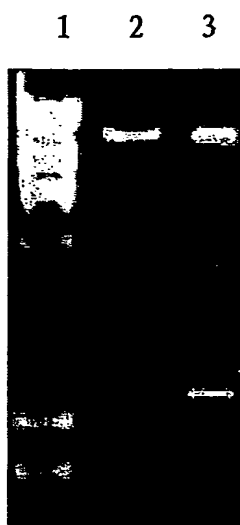


图 1

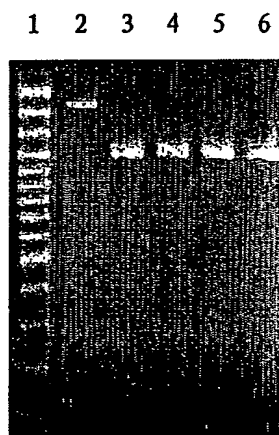


图 2

BEST AVAILABLE COPY

2/2

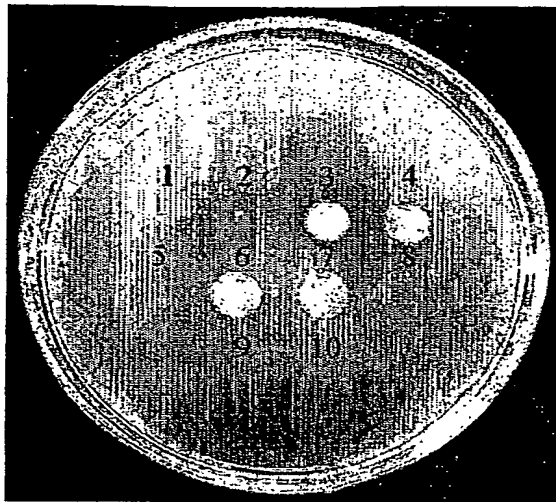


图 3



A.

B.

C.

图 4

BEST AVAILABLE COPY

序列表

<110> 广西大学

<120> 一种编码磷酸烯醇式丙酮酸合成酶的基因

<130> I030726

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 2629

<212> DNA

<213> 野油菜黄单胞菌

<400> 1

```
tttcagcggg gataccggtt ccacgggaca cgtaaaacac cggccgggatt gttgacatcg      60
actccacetc ttigaactag tgtccaaaac ttacgggttc atgcttgtgc aggctccgct      120
gtgcactgca tcatagcggc ttcttctac ggtcgcggcc attcagccc ctcgggcat      180
ggccatacgg agcatcgcgc ttgaacgaga atatcctgtg gttgcatgag ctacgcctgg      240
tcgatctggc ccgctgaggc ggtaaaaatt cctcgcctcg cgagatgatc ggcaacctgg      300
ccgggttggg cgtttcgggt cccgggtgat atgcgaccac tgccgaagca ttcaaggact      360
tcatcgcgca caacgatctg tcaaagcgca ttttcgacaa gctggagacg ctggacgttg      420
aagacgtcac cgcgctcacg gtcgccggca aggagatccg cggctgggtg atcgacgccc      480
cgctgcagcc ggagctggac cgcgacatcc gcagcgccca cgaaaaactc tgcgccgaga      540
acggcggcgg cgaagtggcc gtggctgtgc gttcgtcggc aaccgccgaa gacctgccc      600
atgcctcgtt cgcgggccag caggaaacct tcctcaatgt gaccggcgcc gacgacgttg      660
tgcacaaggt caaggaagta ttgccagcc tctacaacga ccgcgcgatt gcctaccgcg      720
tgcaccacgg cttaagcac gaagatgtgt tcctgtcggc cggcgtgcag ttgatggtgc      780
gctccggcgt gggttcgtcc ggctgttgt tcaccctgga caccgagtc ggcttccgcg      840
acgtggtgtt cgtcacctcc agcttcggcc tgggcgaaat ggtcgtgcaa ggccgggtca      900
atccggacga gttctacgtc tacaagccca cgtcactgc gggcaagccg gcaatcctgc      960
gccgctcgtc cggcagcaag gcaatccgca tgggtgattc ggatgtgccc ggtgaacgcg      1020
tgcgcatcga agacacgccg gtggagttgc gcaacacttt ctcgatcagc gacgaagatg      1080
tgcaggagct ctccaagcag gcgctggtga tcgaaaagca ttacggccgc ccgatggata      1140
tcgagtgggc caaggacggc gtgagcgcca agctgttcat cgtgcaggcg cgcccggaga      1200
cggtgaagtc gcgcagccat gccacccaga tcgagcgttt ctcgctggaa gccaaagacg      1260
ccaagatcct ggtcgaaggc cgtgcggttg gcgccaagat cggcagcggc gtggcacgcg      1320
tggtgcgctc gctggaagac atgaatcgcg tgcaggccgg cgacgtgctg attgccgaca      1380
tgaccgaccc cgattgggag ccggtgatga agcgtgcctc ggccatcgtc accaaccgcg      1440
gtggccgcac ctgccacgcg gcgatcatcg cgcgcgaact gggcgtgccc gcggtggtgg      1500
gttcgggcaa tgcgaccgac gtcatcagcg acggccagga agtcaccgtg agctgcgccg      1560
agggcgacac cggcttcacg tatgaaggct tgctgccggt cgagcgcacc accaccgacc      1620
tgggcaacat gccgcctgcc ccgtcaaga tcatgatgaa cgtggccaac ccggagcgcg      1680
cattcgactt cggccagctg cccaacgccg gtatcggtt ggcgctctg gagatgatca      1740
```

tcgccgcgca catcgccatc catcccaacg cactgctgga atacgacaag caggacgccg 1800
acgtccgcaa gaagatcgac gccaaagattg ccggctacgg cgaccgggtg agcttctaca 1860
tcaaccgcct ggccgaaggc atcgcgaccc tgaccgcgtc ggtggcgccg aacacggtga 1920
tcgtgcggtt gtcggacttc aagtccaacg aatacgccaa cctgatcggt ggctcgcgtt 1980
acgagccgca cgaagagaac ccgatgatcg gcttcgcgg cgccagccgt tatgtcgatc 2040
cgtccttcac caaggcggtc tcgctggagt gcaaggcggg gttgaagggt cgcaacgaga 2100
tgggcctgga caacctctgg gtcattgattc cgttcgtgcg cagctggag gaaggccgca 2160
aggtgatcga ggtgttgagg cagaacgggc tcaacaagg cgagaacggg ctgaagatca 2220
tcatgatgtg cgagctgccg tccaatgcgc tgctggccga tgagttcctg gagatcttcg 2280
acggcttctc gatcggttc aacgacctga cccagctcac cctgggcctg gaccgcgatt 2340
cctcgatcgt ggcgacacgt ttcgacgagc ggaacccggc ggtgaaaaag ctgctgtcga 2400
tggcgatcaa gtcggcgccg gccaaaggca agtacgtggg catctgcggc caggggccgt 2460
cggatcaccg ggaactggcc gagtgggtga tgcaggaagg catcgagtcg gtgtcgtga 2520
atcctgacac cgtggtcgat acctggctgc gcctggccaa gctcaagagc gagggctgat 2580
gggaatgggt ggtggagtgt tggcgccggc tgcgggagcg gccgccgca 2629

<210> 2
<211> 792
<212> PRT
<213> 野油菜黄单胞菌

<400> 2

Leu Asn Glu Asn Ile Leu Trp Leu His Glu Leu Arg Leu Val Asp Leu
1 5 10 15

Ala Arg Val Gly Gly Lys Asn Ser Ser Leu Gly Glu Met Ile Gly Asn
20 25 30

Leu Ala Gly Leu Gly Val Ser Val Pro Gly Gly Tyr Ala Thr Thr Ala
35 40 45

Glu Ala Phe Lys Asp Phe Ile Ala His Asn Asp Leu Ser Lys Arg Ile
50 55 60

Phe Asp Lys Leu Glu Thr Leu Asp Val Glu Asp Val Thr Ala Leu Thr
65 70 75 80

Val Ala Gly Lys Glu Ile Arg Gly Trp Val Ile Asp Ala Pro Leu Gln
85 90 95

Pro Glu Leu Asp Arg Asp Ile Arg Ser Ala Tyr Glu Lys Leu Cys Ala
100 105 110

Glu Asn Gly Gly Gly Glu Val Ala Val Ala Val Arg Ser Ser Ala Thr
115 120 125

Ala Glu Asp Leu Pro Asp Ala Ser Phe Ala Gly Gln Gln Glu Thr Phe
130 135 140

Leu Asn Val Thr Gly Ala Asp Asp Val Val His Lys Val Lys Glu Val
 145 150 155 160

Phe Ala Ser Leu Tyr Asn Asp Arg Ala Ile Ala Tyr Arg Val His His
 165 170 175

Gly Phe Lys His Glu Asp Val Phe Leu Ser Ala Gly Val Gln Leu Met
 180 185 190

Val Arg Ser Gly Val Gly Ser Ser Gly Val Leu Phe Thr Leu Asp Thr
 195 200 205

Glu Ser Gly Phe Arg Asp Val Val Phe Val Thr Ser Ser Phe Gly Leu
 210 215 220

Gly Glu Met Val Val Gln Gly Ala Val Asn Pro Asp Glu Phe Tyr Val
 225 230 235 240

Tyr Lys Pro Thr Leu Thr Ala Gly Lys Pro Ala Ile Leu Arg Arg Ser
 245 250 255

Leu Gly Ser Lys Ala Ile Arg Met Val Tyr Ser Asp Val Pro Gly Glu
 260 265 270

Arg Val Arg Ile Glu Asp Thr Pro Val Glu Leu Arg Asn Thr Phe Ser
 275 280 285

Ile Ser Asp Glu Asp Val Gln Glu Leu Ser Lys Gln Ala Leu Val Ile
 290 295 300

Glu Lys His Tyr Gly Arg Pro Met Asp Ile Glu Trp Ala Lys Asp Gly
 305 310 315 320

Val Ser Gly Lys Leu Phe Ile Val Gln Ala Arg Pro Glu Thr Val Lys
 325 330 335

Ser Arg Ser His Ala Thr Gln Ile Glu Arg Phe Ser Leu Glu Ala Lys
 340 345 350

Asp Ala Lys Ile Leu Val Glu Gly Arg Ala Val Gly Ala Lys Ile Gly
 355 360 365

Ser Gly Val Ala Arg Val Val Arg Ser Leu Glu Asp Met Asn Arg Val
 370 375 380

Gln Ala Gly Asp Val Leu Ile Ala Asp Met Thr Asp Pro Asp Trp Glu
 385 390 395 400

Pro Val Met Lys Arg Ala Ser Ala Ile Val Thr Asn Arg Gly Gly Arg
 405 410 415

Thr Cys His Ala Ala Ile Ile Ala Arg Glu Leu Gly Val Pro Ala Val
 420 425 430

Val Gly Ser Gly Asn Ala Thr Asp Val Ile Ser Asp Gly Gln Glu Val
 435 440 445

Thr Val Ser Cys Ala Glu Gly Asp Thr Gly Phe Ile Tyr Glu Gly Leu
 450 455 460
 Leu Pro Phe Glu Arg Thr Thr Thr Asp Leu Gly Asn Met Pro Pro Ala
 465 470 475 480
 Pro Leu Lys Ile Met Met Asn Val Ala Asn Pro Glu Arg Ala Phe Asp
 485 490 495
 Phe Gly Gln Leu Pro Asn Ala Gly Ile Gly Leu Ala Arg Leu Glu Met
 500 505 510
 Ile Ile Ala Ala His Ile Gly Ile His Pro Asn Ala Leu Leu Glu Tyr
 515 520 525
 Asp Lys Gln Asp Ala Asp Val Arg Lys Lys Ile Asp Ala Lys Ile Ala
 530 535 540
 Gly Tyr Gly Asp Pro Val Ser Phe Tyr Ile Asn Arg Leu Ala Glu Gly
 545 550 555 560
 Ile Ala Thr Leu Thr Ala Ser Val Ala Pro Asn Thr Val Ile Val Arg
 565 570 575
 Leu Ser Asp Phe Lys Ser Asn Glu Tyr Ala Asn Leu Ile Gly Gly Ser
 580 585 590
 Arg Tyr Glu Pro His Glu Glu Asn Pro Met Ile Gly Phe Arg Gly Ala
 595 600 605
 Ser Arg Tyr Val Asp Pro Ser Phe Thr Lys Ala Phe Ser Leu Glu Cys
 610 615 620
 Lys Ala Val Leu Lys Val Arg Asn Glu Met Gly Leu Asp Asn Leu Trp
 625 630 635 640
 Val Met Ile Pro Phe Val Arg Thr Leu Glu Glu Gly Arg Lys Val Ile
 645 650 655
 Glu Val Leu Glu Gln Asn Gly Leu Lys Gln Gly Glu Asn Gly Leu Lys
 660 665 670
 Ile Ile Met Met Cys Glu Leu Pro Ser Asn Ala Leu Leu Ala Asp Glu
 675 680 685
 Phe Leu Glu Ile Phe Asp Gly Phe Ser Ile Gly Ser Asn Asp Leu Thr
 690 695 700
 Gln Leu Thr Leu Gly Leu Asp Arg Asp Ser Ser Ile Val Ala His Leu
 705 710 715 720
 Phe Asp Glu Arg Asn Pro Ala Val Lys Lys Leu Leu Ser Met Ala Ile
 725 730 735
 Lys Ser Ala Arg Ala Lys Gly Lys Tyr Val Gly Ile Cys Gly Gln Gly
 740 745 750

Pro Ser Asp His Pro Glu Leu Ala Glu Trp Leu Met Gln Glu Gly Ile
755 760 765

Glu Ser Val Ser Leu Asn Pro Asp Thr Val Val Asp Thr Trp Leu Arg
770 775 780

Leu Ala Lys Leu Lys Ser Glu Gly
785 790

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2004/001386

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N 15/31

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N A01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

CNKI

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNPAT WPI EPODOC PAJ CA BA GENBANK ETAL
PHOSPHOENOLPYRUV+ SYNTH+ PPS PATHO+ PHYTOPATHO+ XANTHOMONAS ETAL

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE NCBI 'ONLINE! 23 MAY 2002(2002-05-23) DA SILVA,A.C.R ET AL.: "Comparison of the genomes of two Xanthomonas pathogens with differing host specificities" retrieved from NCBI, acccession no. AE012323 see the whole document	1-3
A	& Nature, Vol.417 no.6887, 2002, pages 459-463 CN,A,1357043 03.Jul.2002 (03.07.2002) see the whole document	1-5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
06.Feb.2005(06.02.2005)

Date of mailing of the international search report
17 · MAR 2005 (17 · 03 · 2005)

Name and mailing address of the ISA/CN
6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District,
100088 Beijing, P.R.China

Authorized officer

DING Huiping

Telephone No. (86-10)62085300

Facsimile No. (86-10)62019451

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2004/001386

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Chinese Journal of Biotechnology, Vol. 19, No. 6, Nov. 2003, LU Guang Tao et al, "Identification and Cloing of a Novel Gene Involved in EPS Biosynthesis of Xanthomonas campestris pv. campestris", pages 661-667	1-5
A	US,B1,6262343, 17.Jul. 2001(17.07.2001) See the whole document	1-5
A	Journal of bacteriology, Vol.172, no.10,1990,V.DE CRECY-LAGARD ET AL, "A Xanthomonas campestris pv. Campestris Protein Simimlar to Catabolite Activation Factor Is Involved in Regulation of Phytopathogenicity" pages 5877-5883	1-5

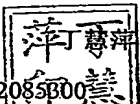
INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2004/001386

CN1357043A	03.07.2002	JP2003503025T	28.01.2003
		WO0078967 A1	28.12.2000
		FR2795423 A1	29.12.2000
		AU200064512 A	09.01.2001
		BR200011889 A	05.03.2002
		EP1190062 A1	27.03.2002
US6262343B1	17.07.2001	WO0107635A	01.02.2001
		AU2214700A	13.02.2001
		US2002012981A	31.01.2002
		MXP02000884A	06.08.2002
		US6762285B	13.07.2004

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2004/001386

A. 主题的分类 IPC 7 C12N 15/31 按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C12N A01N 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 CNKI		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNPAT WPI EPODOC PAJ CA BA GENBANK ETAL PHOSPHOENOLPYRUV+ SYNTH+ PPS PATHO+ PHYTOPATHO+ XANTHOMONAS ETAL 磷酸烯醇 丙酮酸 合成酶 合酶 致病 病原 黄单胞菌 等		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	DATABASE NCBI 'ONLINE! 23. 5 月 2002(23.05.2002) DA SILVA,A.C.R 等.: "Comparison of the genomes of two Xanthomonas pathogens with differing host specificities" retrieved from NCBI, acccession no. AE012323 见序列	1-3
A	& Nature, 第 417 卷, 第 6887 期, 2002 年出版, 第 459-463 页 CN,A,1357043(罗狄亚化学公司)2002 年 7 月 3 日 (03.07.2002) 见全文	1-5
A	生物工程学报, 第 19 卷, 第 6 期, 2003 年 11 月出版, 陆光涛等, "野油菜黄单胞菌野油菜致病变种中一个与 EPS 合成有关的新基因的鉴定", 第 661-667 页	1-5
A	US,B1,6262343(The Regents of the University of California),2001 年 7 月 17 日 (17.07.2001), 见全文	1-5
A	Journal of bacteriology, 第 172 卷, 第 10 期, 1990 年出版,V,DE CRECY-LAGARD 等, "A Xanthomonas campestris pv. Campestris Protein Simimilar to Catabolite Activation Factor Is Involved in Regulation of Phytopathogenicity" 第 5877-5883 页	1-5
<input type="checkbox"/> 其余文件在 C 栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 06.2 月 2005(06.02.2005)		国际检索报告邮寄日期 17. 3 月 2005 (17. 03. 2005)
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号: (86-10)62019451		授权官员  电话号码: (86-10)62085800

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2004/001386

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN1357043A	03.07.2002	JP2003503025T	28.01.2003
		WO0078967 A1	28.12.2000
		FR2795423 A1	29.12.2000
		AU200064512 A	09.01.2001
		BR200011889 A	05.03.2002
US6262343B1	17.07.2001	EP1190062 A1	27.03.2002
		WO0107635A	01.02.2001
		AU2214700A	13.02.2001
		US2002012981A	31.01.2002
		MXP02000884A	06.08.2002
		US6762285B	13.07.2004